



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 330 177**

⑫ Número de solicitud: 200701558

⑬ Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑮ Fecha de presentación: **31.05.2007**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **04.12.2009**

Fecha de la concesión: **27.08.2010**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **23.09.2010**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
23.09.2010

⑲ Titular/es: **Universidad de Málaga**
Plaza de El Ejido, s/n
29071 Málaga, ES

⑳ Inventor/es: **Porta Pelayo, José María;**
Porta Pelayo, Javier y
Álvarez Herrero, María del Carmen

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Procedimiento genético de tipificado para *Dicentrarchus labrax*.**

㉓ Resumen:

Procedimiento genético de tipificado para *Dicentrarchus labrax*.

La presente invención se refiere a un procedimiento para el genotipado de *Dicentrarchus labrax* que comprende: a) extraer una muestra de ADN de *Dicentrarchus labrax*; b) amplificar dicha muestra de ADN llevando a cabo al menos una PCR múltiplex en la que se utilizan al menos cinco pares de cebadores, seleccionándose dichos pares de cebadores del grupo que consiste en: SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 21, SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 23, SEC ID NO: 24; y c) detectar por medios adecuados los fragmentos amplificados en la etapa (b).

La invención también se refiere a un kit para el genotipado de *Dicentrarchus labrax*.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Procedimiento genético de tipificado para *Dicentrarchus labrax*.

5 La presente invención está relacionada con la biología molecular. En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento y kit para el genotipado de la especie de *Dicentrarchus labrax* que permiten, entre otros, determinar el pedigrí y el parentesco molecular de un individuo perteneciente a esta especie.

10 Estado de la técnica anterior

La acuicultura es uno de los sectores económicos con mayor avance en los últimos años. Entre las especies de mayor interés en Europa destaca la lubina, *Dicentrarchus labrax* (también abreviado como *D. labrax*).

15 El éxito de la acuicultura moderna se basa en el control sobre la reproducción de las especies, el mejor conocimiento de su biología, y en las innovaciones tecnológicas. Sin embargo, en el cultivo de *Dicentrarchus labrax* son muchas las dificultades que surgen en el control y manejo de los stocks reproductores, debido fundamentalmente al elevado número de individuos que se manejan, la dificultad para identificar a los padres o para identificar huevos o larvas en los primeros meses de desarrollo. Estos y otros aspectos imposibilitan un control integral de la reproducción de esta especie en cautividad (i.e., piscifactoría).

20 De la misma forma el control de la trazabilidad supone un reto para garantizar la seguridad alimenticia de los productos derivados de la explotación comercial de esta especie, tanto el criado en cautividad (piscifactoría) como el procedente del medio natural.

25 En la actualidad se puede encontrar en distintas bases de datos, abundante información sobre secuencias de ADN descritas para *D. labrax*. Esta información permite llevar a cabo el genotipado de individuos de formas muy variadas.

30 Sin embargo hasta la actualidad, no se ha estandarizado ningún procedimiento para llevar a cabo dicho genotipado para *D. labrax*. Por lo tanto, resulta deseable diseñar herramientas precisas que permitan genotipar los individuos de esta especie con el fin de controlar, mejorar y conservar esta especie, tanto en poblaciones criadas en cautividad así como en el medio natural.

35 Explicación resumida de la invención

Los inventores han desarrollado y automatizado un procedimiento genético de genotipado y su correspondiente kit para la especie piscícola de lubina *Dicentrarchus labrax*.

40 La presente invención proporciona una herramienta molecular que permite descifrar la huella genética de cada individuo, la cual permanece invariable a lo largo de su vida, e incluso una vez muerto. Además permite conocer la procedencia familiar de cada individuo y por tanto las relaciones de parentesco entre individuos y sus genealogías. Esta información permite controlar e incluso mejorar las características de los stocks reproductores de *D. labrax*.

45 De esta manera, la presente invención se refiere a un procedimiento para el genotipado de *Dicentrarchus labrax* que comprende: a) extraer una muestra de ADN de *Dicentrarchus labrax*; b) amplificar dicha muestra de ADN llevando a cabo al menos una PCR multiplex en la que se utilizan al menos cinco pares de cebadores, seleccionándose dichos pares de cebadores del grupo que consiste en: SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 21, SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 23, SEC ID NO: 24; y c) detectar por medios adecuados los fragmentos amplificados en la etapa (b).

55 El genotipado consiste en caracterizar regiones determinadas del genoma (marcadores moleculares) de un individuo, para descubrir en él rasgos exclusivos (alelos) que lo distingan del resto de individuos de su especie. Para llevar a cabo el genotipado de un individuo mediante esta herramienta, se requieren concentraciones muy bajas de ADN (50 ng) que pueden obtenerse de una pequeña muestra que contenga células del individuo, tales como sangre, huevos, larvas, fragmentos de aleta, de tejidos de peces muertos o despiezados e incluso procesados. El resultado de este análisis en un individuo, constituye su seña de identidad más fiable.

60 El procedimiento de la presente invención permite la identificación de un individuo de entre millones con una altísima precisión. Además permite realizar estudios de pedigrí para identificar a los padres biológicos de un individuo y de forma escalonada obtener información sobre genealogías o poblaciones. Estas aplicaciones son fundamentales para el control y manejo de los stocks reproductores en la acuicultura de *D. labrax*, así como de su progenie, o bien para rastrear la trazabilidad de los individuos y asegurar así la salud alimenticia de los consumidores, entre otros.

Otras ventajas del procedimiento de la presente invención son: a) el procedimiento implementado de PCR múltiplex reduce el tiempo y coste de la técnica, minimizando el riesgo de errores de manejo, ya que se reduce considerablemente la manipulación; b) la metodología es sencilla, sólida y reproducible, asegurando unos resultados precisos; c) estandarización de los loci empleados y posible comparación de resultados de distintos trabajos realizados con esta herramienta; y d) los loci empleados en el procedimiento de la invención son altamente informativos.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un kit para el genotipado de *Dicentrarchus labrax* mediante el procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la invención, que comprende al menos cinco pares de cebadores para llevar a cabo al menos una PCR multiplex, seleccionándose dichos pares de cebadores del grupo que consiste en: SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 21, SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 23, SEC ID NO: 24.

Estas herramientas se pueden emplear para controlar la estructura genética de los stocks y así mantener niveles de variabilidad acordes con una óptima eficiencia biológica, aplicar métodos de selección y/o facilitar un seguimiento preciso de los procesos de reproducción, cría, comercialización y trazabilidad. Este control de los stocks permitiría evitar posibles desastres ecológicos en las poblaciones naturales, tras posibles escapes o repoblación.

El kit de la presente invención se ha probado con excelentes resultados, en la identificación de individuos y determinación del pedigrí en individuos nacidos en una granja de lubinas, aspecto de singular importancia en el cultivo de peces ya que no es posible hacer un seguimiento de los reproductores que realmente participan en las puestas, a menos que se haga fecundación artificial. Además esta herramienta se ha probado en la caracterización genética de una población de 50 individuos procedentes del medio natural.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Explicación detallada de la invención

En la presente invención el término “PCR multiplex” se refiere a una variante de la reacción de la polimerasa en cadena en el que se coamplifican varios loci en una sola reacción.

En la presente invención el término “marcador molecular” se refiere a loci microsatélites (es decir, secuencias de ADN en el que se repiten un motivo de 2-7 nucleótidos en tándem) que se distribuyen de manera aleatoria a lo largo del genoma de los organismos. Este tipo de marcadores constituyen zonas muy variables, y por tanto distintas, de unos individuos a otros. Los marcadores moleculares en los que se basa el procedimiento de genotipado de la presente invención están disponibles en bases de datos públicas como la Genbank. En la siguiente tabla se adjunta información sobre el nombre del locus, nº de acceso a dicha base de datos y la secuencia de los cebadores empleados en la amplificación, así como su orientación (directo (“forward”) e inverso (“reverse”)).

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

Locus	NºAcceso	Secuencia 5'-3'
Dla0007	AY221745	Directo-AGAAACTGAACTGACTGCTGC Inverso-CATTGTGTGTTTAGTGTAATC
Dla0004	AY221742	Directo-TCCTTCCGTGAACTGAGAGC Inverso-CTGGCATCACAGGACACTGC
DLY13158	Y13158	Directo-AATACGGTGGTGAATCAG Inverso-GCTGTTGTCTTGCTGCAT
Dla0009	AY221747	Directo-CAGGAAAGTCAGTCAAGCACA Inverso-TACACAACCATGGTCCATCC
Dla0020	AY262077	Directo-GTCTAATGAGCAGTGGAGCAG Inverso-GCATGTTAGATCCACCTCTTTC
Labrax 9	-----	Directo-TACAGCACCTCTTGAGAAGGG Inverso-GGCGTACTGCAGGAAAACAG
Dla12	AY125920	Directo-GTATGTTGCCAGAGCCAAGC Inverso-CAGACAACTGTATGCCTGC
Dla0008	AY221746	Directo-AAGCTATCTGATCTCGCTTG Inverso-ACGTGATTAAGTGTTTGTGAG
Dla0011	AY221749	Directo-TCGGAGCTGATATTGTGCAG Inverso-CCCCATTGTAACAGCAAGTTC
Dla0116	AY302256	Directo-CACAGCCGAAAATAATCCAG Inverso-AGACCGTAACACCTGCCAAC
Dla0016	AY262073	Directo-GTGACCGCAGATGAAGAAC Inverso-ACTGTGGGCTCATAAACATC
Dla0119	AY302259	Directo-GCAGGTTCAAATTATTTTGTCTC Inverso-TCCTCCTTTTGCTTGCTAGG

Sobre el marcador molecular denominado Labrax 9 se encuentra la información necesaria en el artículo publicado por García de León FJ *et al.*, "Development and use of microsatellite markers in sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) (Perciformes: Serranidae)", *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1995, vol. 4, pp.: 62-68.

Los otros pares de cebadores usados en el procedimiento de la presente invención están también disponibles en la literatura científica (cfr. C. S. Tsigenopoulos *et al.*, "Eleven new microsatellites of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)", 2003, *Molecular Ecology Notes*, vol. 3, pp. 352-354; Chistiakov, D. A., *et al.*, "Development and linkage relationships for new microsatellite markers of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)", 2004, *Anim. Genet.*, vol. 35 (1), pp. 53-57; Castilho, R. *et al.*, "Two polymorphic microsatellite markers in the European seabass, *Dicentrarchus labrax* (L.)", 1998, *Anim. Genet.*, vol. 29 (2), pp. 151-152; Ciftci, Y. *et al.*, "More polymorphic microsatellite markers in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)", 2002, *Mol. Ecol. Notes*, vol. 2 (4), pp. 575-576).

Los inventores de la presente invención han descubierto que estudiando estas regiones en una muestra se puede distinguir a un individuo del resto de individuos de la misma especie de *Dicentrarchus labrax* con una altísima precisión. Cuanto más numerosas y variables sean estas regiones, mayor precisión se obtiene en el resultado.

La muestra de ADN puede proceder de huevos (con 24 o más horas de vida), larvas, sangre, músculo y aleta caudal, entre otros. La extracción de ADN se lleva a cabo siguiendo protocolos bien conocidos para el experto en la materia. Ejemplos ilustrativos y no limitativos incluyen la precipitación salina (Martínez *et al.*, "A protein salting-out method applied in genomic DNA isolation from fish whole blood", *BioTechniques*, 1998, vol. 24, pp. 238-239); el uso de resinas de Chelex® (Estoup A, Turgeon J (1996) "Microsatellite markers: isolation with non radioactive probes and amplification" disponible en <http://www.inapg.inra.fr/dsa/microsat/microsat.htm>). Todos estos procedimientos proporcionan una muestra de ADN cualitativa y cuantitativamente idónea para la obtención de resultados altamente fiables, si bien combinando muestras y estrategias alternativas, es posible optimizar los resultados.

En una realización preferida, la etapa (b) consiste en una PCR multiplex en la que se utilizan seis pares de cebadores. A lo largo de la descripción se hace referencia a esta realización como "Reacción A" o "Reacción B" dependiendo del grupo de pares de cebadores escogido para llevar a cabo la PCR multiplex. Preferiblemente, dichos pares de cebadores son: SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9- SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12, o bien: SEC ID NO: 13,

ES 2 330 177 B2

SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 21, SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 23, SEC ID NO: 24.

En todavía otra realización preferida, la etapa (b) se lleva a cabo mediante una primera PCR multiplex con seis pares de cebadores seleccionados del grupo que consiste en: SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12, o bien son: SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 21, SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 23, SEC ID NO: 24, y una segunda PCR multiplex con los seis pares de bases restantes que no han sido utilizados en la primera PCR multiplex. Esta realización es también referida a lo largo de la descripción como "Reacción A+B". Preferiblemente, una de las PCR multiplex se lleva a cabo con el grupo de cebadores que consiste en SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12 y la otra PCR multiplex se lleva a cabo con el grupo de cebadores que consiste en: SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 21, SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 23, SEC ID NO: 24.

El alto poder de exclusión del procedimiento de la invención permite que en muchos estudios no sea necesario el empleo de los doce loci. Por ello, en realizaciones preferidas el procedimiento se puede dividir en dos reacciones: A (con 6 pares de cebadores) y B (con los otros seis pares de cebadores). Preferiblemente cada una de las reacciones A y B se lleva a cabo con 6 loci cada una. Las reacciones A y B se pueden llevar a cabo de manera independiente o bien conjuntamente para conseguir el mayor poder discriminatorio.

Las reacciones A y B pueden indistintamente ser usadas en estudios de poblaciones naturales o en estudios de pedigrí en poblaciones cultivadas cuando el número de reproductores en tanques no sea muy elevado. Cuando se desee un mayor poder de exclusión es recomendable el uso de las dos reacciones A + B.

Para el análisis automático de las muestras mediante fluorescencia es adecuado marcar uno de los cebadores de cada pareja con una molécula fluorescente. Así, preferiblemente al menos uno de los cebadores de cada par de cebadores está marcado con una etiqueta de fluorescencia.

Existen varias empresas que suministran cebadores marcados hasta con 5 rangos de fluorescencia, lo cual permite discernir moléculas de loci distintos aunque tengan el mismo tamaño. Ejemplos ilustrativos y no limitativos incluyen, 6-FAM NED, PET y VIC (todas ellas suministradas por Applied Biosystem). En las reacciones A y B, los distintos cebadores deben presentar diferentes señales de fluorescencia. El tipo de moléculas para el marcaje depende del tipo de aparato secuenciador empleado.

En otra realización preferida la PCR multiplex se lleva a cabo en las condiciones de: 5 minutos a 95°C, 25 ciclos de 30 segundos cada uno a 95°C, 30 segundos a 58°C y 45 segundos a 72°C, seguido de 7 minutos a 72°C.

En una realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para el genotipado de *Dicentrarchus labrax* que comprende: a) extraer una muestra de ADN de *Dicentrarchus labrax*; b) amplificar dicha muestra de ADN llevando a cabo una PCR multiplex en la que se utilizan seis pares de cebadores: SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12, en las condiciones de 5 minutos a 95°C, 25 ciclos de 30 segundos cada uno a 95°C, 30 segundos a 58°C y 45 segundos a 72°C, seguido de 7 minutos a 72°C; y c) detectar por medios adecuados los fragmentos amplificados en la etapa (b).

En otra realización la presente invención se refiere a un procedimiento para el genotipado de *Dicentrarchus labrax* que comprende: a) extraer una muestra de ADN de *Dicentrarchus labrax*; b) amplificar dicha muestra de ADN llevando a cabo una PCR multiplex en la que se utilizan seis pares de cebadores: SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 21, SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 23, SEC ID NO: 24, en las condiciones de 5 minutos a 95°C, 25 ciclos de 30 segundos cada uno a 95°C, 30 segundos a 58°C y 45 segundos a 72°C, seguido de 7 minutos a 72°C; y c) detectar por medios adecuados los fragmentos amplificados en la etapa (b).

En otra realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para el genotipado de *Dicentrarchus labrax* que comprende: a) extraer una muestra de ADN de *Dicentrarchus labrax*; b) amplificar dicha muestra de ADN llevando a cabo una primera PCR multiplex con seis pares de cebadores seleccionados del grupo que consiste en: SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 21, SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 23, SEC ID NO: 24 y una segunda PCR multiplex con los seis pares de cebadores restantes no utilizados en la primera PCR multiplex, llevándose a cabo las dos PCR multiplex en las condiciones de 5 minutos a 95°C, 25 ciclos de 30 segundos cada uno a 95°C, 30 segundos a 58°C y 45 segundos a 72°C, seguido de 7 minutos a 72°C; y c) detectar por medios adecuados los fragmentos amplificados en la etapa (b). Preferiblemente, las dos PCR multiplex de la etapa (b) se llevan a cabo de manera secuencial. Alternativamente, las dos PCR multiplex se llevan a cabo simultáneamente.

Los medios adecuados para detectar los fragmentos amplificados en la etapa (b) incluyen cualquiera de las técnicas bien conocidas para el experto en la materia. Preferiblemente, la etapa (c) comprende: i) analizar la muestra resultante de la etapa (b) mediante electroforesis utilizando marcadores de peso molecular interno; y ii) secuenciar los fragmentos identificados en la etapa (i).

En la presente invención el término “marcador de peso molecular interno” se refiere a un conjunto de fragmentos de ADN de tamaños conocidos que se añaden a la reacción de PCR y que sirve para determinar el tamaño de los diferentes fragmentos generados durante la PCR. Hay disponibles comercialmente una gran variedad de estos marcadores en función de los fragmentos que se deseen identificar.

La invención proporciona en una realización preferida, un kit de acuerdo con el segundo aspecto de la invención que comprende los siguientes pares de cebadores para llevar a cabo una PCR multiplex: SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12.

En otra realización preferida, el kit comprende los siguientes pares de cebadores para llevar a cabo una PCR multiplex: SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 21, SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 23, SEC ID NO: 24.

En aún otra realización preferida, el kit comprende un primer grupo de pares de cebadores que consiste en: SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12, y un segundo grupo de pares de cebadores que consiste en: SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 21, SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 23, SEC ID NO: 24 para llevar a cabo dos PCR multiplex de manera secuencial o simultánea.

Mediante el procedimiento y kit de la presente invención se consigue un valor probabilidad de identidad de hasta $1,78 \times 10^{-15}$, lo que indica que la probabilidad de que dos individuos presenten la misma huella de identidad es prácticamente cero.

Una posible aplicación del procedimiento y kit de la presente invención es la de realizar estudios de pedigrí mediante métodos de exclusión molecular. La exclusión directa se basa en el hecho biológico por el que un individuo es el resultado de la combinación de la mitad del genoma de sus padres. El poder de exclusión de estas herramientas se puede medir mediante estimadores de exclusión (Valor de Exclusión 1 cuando ninguno de los parentales es conocido y Valor de Exclusión 2 cuando al menos conocemos uno de los padres). El procedimiento y kit de la presente invención proporciona valores de exclusión 1 y 2 de 0,999986 y 0,99999994 respectivamente, lo que evidencia su alta potencia. (Marshall TC, *et al.*, “Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations”, 1999, *Molecular Ecology*, vol. 7, pp. 639-655).

De la misma forma la siguiente tabla muestra la sensibilidad de las reacciones A, B y A+B.

Reacciones	Mp	V. de Exclusión 1	V. de Exclusión 2
A	$1,41 \times 10^{-7}$	0,988860	0,9990
B	$1,25 \times 10^{-8}$	0,998743	0,9999
A+B	$1,78 \times 10^{-15}$	0,999986	0,99999994

Este protocolo permite la estandarización y automatización de la técnica de tipificación o genotipado de forma sencilla y completamente reproducible. Los kits desarrollados se basan en la metodología descrita con anterioridad, con la particularidad de que los cebadores están marcados con etiquetas fluorescentes específicas para el análisis en secuenciadores automáticos tipo AB 310, 3100, 3130 y 3130 Avance (Applied Biosystem), entre otros.

Ejemplos

Ejemplo 1

Caracterización genética de las reacciones PCR multiplex A y B en una población natural

A partir de 50 muestras de aletas de individuos del medio natural se procedió a la extracción y purificación de ADN genómico usando un método de extracción salina (Martinez *et al.*, “A protein salting-out method applied in genomic DNA isolation from fish whole blood”, *BioTechniques*, 1998, vol. 24, pp. 238-239). De cada muestra de ADN se realizaron las 2 PCR multiplex, A y B. Para llevar a cabo la reacción A se utilizaron los pares de cebadores: SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12; mientras que para llevar a cabo la reacción B se

ES 2 330 177 B2

utilizaron los pares de cebadores: SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 21, SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 23, SEC ID NO: 24.

5 Las proporciones de reactivos y cebadores fueron los siguientes:

- Proporción de reactivos: 1 μ l de ADN (50-500 ng), 1 μ l de Buffer (10X), 1 μ l de ClMg_2 (15 mM), 1 μ l de dNTPs (2 mM), 3 μ l de primer mix A (5 pmol/ μ l), 3 μ l de H_2O bidestilada estéril, 0,2 μ l de Taq Gold (5 U/ μ l; Applied Biosystem).
- 10 - Proporciones de cebadores para la Reacción A: 2,5 de Dla0006 (5 pmol/ μ l), 2 de Dla0009 (5 pmol/ μ l), 6 de Dla0007 (5 pmol/ μ l), 2 de Dla0020 (5 pmol/ μ l), 2,5 de Dla0004 (5 pmol/ μ l) y 7 de Labrax 9 (5 pmol/ μ l).
- 15 - Proporción de cebadores para la Reacción B: 1,15 de Dla0116 (5 pmol/ μ l), 7 de Dla0011 (5 pmol/ μ l), 7 de Dla016 (5 pmol/ μ l), 4 de Dla0119 (5 pmol/ μ l), 3 de Dla0008 (5 pmol/ μ l) y 3 de Dla12 (5 pmol/ μ l).

Entre paréntesis se presentan las concentraciones de partida de las soluciones stock de cada reactivo.

20 La preparación de los diferentes reactivos y cebadores para llevar a cabo las reacciones A, B y A+B para su carga en el secuenciador fue:

- 25 i) Preparación de la Reacción A: añadir 1 μ l de la Reacción A, 0,5 μ l del marcador de peso molecular interno 500 LIZTM Size Standard (Applied biosystem) y 10 μ l de formamida desionizada. Desnaturalizar 10 minutos a 94°C y poner en frío hasta su carga en el aparato;
- ii) Preparación de la Reacción B: añadir 2 μ l de la Reacción B, 0,5 μ l de 500 LIZTM Size Standard (Applied biosystem) y 10 μ l de formamida desionizada. Desnaturalizar 10 minutos a 94°C y poner en frío hasta su carga en el aparato.
- 30 iii) Preparación de la mezcla de reacciones A y B: añadir 1 μ l de la reacción A, 2 μ l de la reacción B, 0,5 μ l de 500 LIZTM Size Standard (Applied biosystem) y 10 μ l de formamida desionizada. Desnaturalizar 10 minutos a 94°C y poner en frío hasta su carga en el aparato.

35 Ambas reacciones de PCR multiplex se llevaron a cabo en las condiciones de: 5 minutos a 95°C, 25 ciclos de 30 segundos cada uno a 95°C, 30 segundos a 58°C y 45 segundos a 72°C, seguido de 7 minutos a 72°C.

Para llevar a cabo la separación electroforética y secuenciación de los diferentes fragmentos, se ajustaron los parámetros del aparato utilizado siguiendo las instrucciones del fabricante. Para este caso particular, los parámetros de separación electroforética y obtención automática de los datos fueron los siguientes:

40 Módulo: GS STR POP4 (1 ml) G5.md5
Matriz: Matrix standard set DS33
45 Parámetros: GS500Analysis.gsp
Voltaje de carrera: 15000 voltios
Voltaje de inyección: 15000 voltios
50 Duración de inyección: 7 segundos
Temperatura: 60°C
55 Poder del láser: 9 mWattios

60 A partir de los genotipos obtenidos se procedió a la caracterización genética de los loci analizados en una población natural. Para ello, se estudiaron los siguientes parámetros: Número de alelos, rango de tamaño, probabilidad de alelos nulos y poder de exclusión de los mismos usando el programa CERVUS versión 2.0 y siguiendo las instrucciones del manual.

Los resultados del análisis se detallan en la Tabla 2.

65

TABLA 2

Locus	Repetición	Nº alelos	Rango de alelos	Prob. Alelos nulos	Poder de exclusión	Probabilidad de identidad
Dla 0007	GT	11	126-150	0,1179	0,544	0,0643
Dla0004	GT	11	163-191	0,0516	0,526	0,0786
Dla6	GT	8	60-86	0,1893	0,281	0,1990
Dla0009	GT	21	101-147	0,0173	0,751	0,0179
Dla0020	GT	12	146-182	0,0270	0,473	0,1038
Labrax 9	GT	20	160-204	0,0458	0,455	0,0819
Dla12	GT	18	216-254	-0,0131	0,699	0,0275
Dla0008	GT	36	214-304	0,0265	0,812	0,0094
Dla0011	GT	20	168-214	-0,0028	0,699	0,0273
Dla0116	GT	6	202-212	-0,0029	0,366	0,1696
Dla0016	GT	19	81-133	-0,0175	0,893	0,0305
Dla0119	GT	19	228-262	-0,0129	0,883	0,0381
Reacción A		52	60-204		0,988860	1.41×10^{-7}
Reacción B		118	81-304		0,998743	1.25×10^{-8}
Reacción A+B		170	60-304		0,999986	1.78×10^{-15}

Probabilidad de identidad: representa la inversa del número de individuos que deben ser analizados antes de encontrar el mismo genotipo en una muestra seleccionada al azar (Más información en LISETTE P. WAITS, GORDON LUIKART and PIERRE TABERLET, 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. Molecular Ecology 10, 249-256.

El poder de exclusión se refiere a la probabilidad de que un adulto escogido al azar sea excluido como parental de un descendiente (Información adicional se puede obtener del artículo Marshall *et al.*, *supra*).

De los resultados obtenidos se puede destacar: el elevado número de alelos que presentan los distintos loci en esta población, unos patrones y rangos de tamaños de los alelos adecuados para llevar a cabo el genotipado en multiplex. No hay indicios de que existan alelos nulos. Además los valores de exclusión obtenidos tanto en la reacción A, B, o ambas (A+B) indican que los cebadores seleccionados son los adecuados para llevar a cabo estudios genéticos de la población de *D. labrax* con una gran precisión.

Ejemplo 2

Creación y caracterización de un banco de esperma de lubina *Dicentrarchus labrax* L. de una población mediterránea

El stock de partida consiste en 61 ejemplares sexualmente maduros de lubina (42 machos y 18 hembras) capturados en la costa mediterránea de Murcia durante los periodos, de enero a marzo del 2000, y de noviembre a marzo del 2001. Los peces se trasladaron al COM donde se marcaron con microchips y se caracterizaron por los rasgos biológicos de interés. Actualmente se mantienen en un tanque de 45 m³ en condiciones naturales de temperatura y fotoperiodo con una alimentación a base de pienso para reproductores y pescado fresco.

A partir de los reproductores se tomaron muestras de aleta que se conservaron en etanol al 70% a 4°C hasta la extracción de ADN. Éste se obtuvo mediante precipitación salina empleando el método de Martínez y colaboradores (Martínez *et al.*, *supra*). La calidad y concentración del ADN aislado fue revisada mediante visualización en geles de agarosa al 0,8% y espectrofotometría.

La caracterización de la estructura genética del stock natural se llevó a cabo mediante el genotipado de todos los individuos usando un conjunto de 10 loci microsatélite: Dla 11(AY221749), Dla 12(AY125920), Dla 6(Y13158), Dla 16(AY262073), Dla 9(AY221747), Dla 4(AY221742), Dla 119(AY302259), Dla 20(AY262077), Dla 116(AY302256)

y D1a 8 (AY221746). Los productos de amplificación de estos loci se analizaron en un secuenciador automático ABI 310 (Applied Biosystem) tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1 de más arriba.

A partir de los genotipos obtenidos se llevó a cabo la caracterización genética del grupo analizado.

Para caracterizar la población se emplearon los siguientes parámetros genéticos: número de alelos por locus (K), heterocigosidad observada y esperada (H_o y H_e respectivamente), contenido de información polimórfico (PIC) y la probabilidad de exclusión 1 y 2 (EXC 1 y EXC 2; la exclusión 1 es la probabilidad de asignamiento correcto de un individuo a su pareja parental cuando no se conoce ninguno de parentales, y la 2 es la probabilidad cuando se conoce uno de los padres) y utilizando el software CERVUS versión 2.0 (Marshall *et al.*, *supra*). Además, se estudió si este grupo cumplía las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg (valores p), así como el posible déficit o exceso de heterocigotos (Fis), utilizando el software GENEPOP (Raymond M, Rousset F genepop (Version 1.2): "Population genetic software for exact test and ecumenicism", *Journal of Heredity*, 1995, vol. 86, pp. 248-249).

Los resultados de la caracterización genética de la población muestran unos niveles de variabilidad genética representados por: un número medio de alelos por locus de 16,8, una heterocigosidad media observada y esperada de 0,798 y 0,842 respectivamente y un contenido medio de información polimórfico de 0,816. El valor de exclusión total 1 y 2 es de 0,99981 y 0,999998 respectivamente. Por otro lado la población se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,001$), mostrando un ligero déficit de heterocigotos para algunos de los loci.

Los parámetros genéticos se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

Parámetros genéticos poblacionales del stock de lubina D. labrax L. de una población mediterránea

Locus	Nº Acceso	k	H(O)	H(E)	HW(p-val)	Fis	PIC	Excl(1)	Excl(2)
D1a11	AY221749	19	0,814	0,926	0,0236	0,122	0,913	0,717	0,835
D1a12B	AY12592	17	0,881	0,91	0,5498	0,032	0,895	0,673	0,805
D1a6	Y13158	9	0,579	0,685	0,3662	0,155	0,625	0,265	0,431
D1a16	AY262073	20	0,864	0,866	0,0551	0,002	0,844	0,567	0,724
D1a9	AY221747	17	0,915	0,915	0,624	0	0,9	0,685	0,813
D1a4	AY221742	11	0,797	0,827	0,2894	0,037	0,8	0,485	0,657
D1a119	AY302259	19	0,847	0,859	0,008	0,014	0,839	0,559	0,719
D1a20	AY262077	11	0,759	0,764	0,3372	0,008	0,737	0,396	0,581
D1a116	AY302256	6	0,583	0,719	0,0087	0,19	0,667	0,299	0,473
D1a8	AY221746	39	0,948	0,95	0,1884	0,002	0,939	0,798	0,887

Si bien estos resultados parecen indicar que los individuos tomados del medio natural corresponden a una población salvaje, las desviaciones en la proporción de heterocigotos en algunos de los loci podría deberse a un posible efecto Wahlund o a la influencia de la acuicultura sobre las poblaciones naturales, como se describe en trabajos anteriores.

De forma adicional, la disponibilidad del marcaje individual mediante el genotipado de 10 loci, va a permitir su identificación genética con alta probabilidad. Esta identificación se puede utilizar en distintas aplicaciones de seguimiento del esperma o de trazabilidad de la descendencia que se genere con el banco de esperma desarrollado.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el genotipado *Dicentrarchus labrax* que comprende:

a) extraer una muestra de ADN de *Dicentrarchus labrax*;

b) amplificar dicha muestra de ADN llevando a cabo al menos una PCR multiplex en la que se utilizan al menos cinco pares de cebadores, seleccionándose dichos pares de cebadores del grupo que consiste en: SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 21, SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 23, SEC ID NO: 24;

c) detectar por medios adecuados los fragmentos amplificados en la etapa (b).

2. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que la etapa (b) consiste en una PCR multiplex en la que se utilizan seis pares de cebadores.

3. Procedimiento según la reivindicación 2 en el que los seis pares de cebadores son: SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12.

4. Procedimiento según la reivindicación 2 en el que los seis pares de cebadores son: SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 21, SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 23, SEC ID NO: 24.

5. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que la etapa (b) se lleva a cabo mediante una primera PCR multiplex con seis pares de cebadores seleccionados del grupo que consiste en: SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 21, SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 23, SEC ID NO: 24, y una segunda PCR multiplex con los seis pares de cebadores restantes que no han sido utilizados en la primera PCR multiplex.

6. Procedimiento según la reivindicación 5 en el que una de las PCR multiplex se lleva a cabo con el grupo de cebadores que consiste en SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12 y la otra PCR multiplex se lleva a cabo con el grupo de cebadores que consiste en: SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 21, SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 23, SEC ID NO: 24.

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la reacción de PCR multiplex se lleva a cabo en las condiciones de: 5 minutos a 95°C, 25 ciclos de 30 segundos cada uno a 95°C, 30 segundos a 58°C y 45 segundos a 72°C, seguido de 7 minutos a 72°C.

8. Procedimiento según la reivindicación 1 que comprende:

a) extraer una muestra de ADN de *Dicentrarchus labrax*;

b) amplificar dicha muestra de ADN llevando a cabo una PCR multiplex en la que se utilizan seis pares de cebadores: SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12, en las condiciones de 5 minutos a 95°C, 25 ciclos de 30 segundos cada uno a 95°C, 30 segundos a 58°C y 45 segundos a 72°C, seguido de 7 minutos a 72°C; y

c) detectar por medios adecuados los fragmentos amplificados en la etapa (b).

9. Procedimiento según la reivindicación 1 que comprende:

a) extraer una muestra de ADN de *Dicentrarchus labrax*;

b) amplificar dicha muestra de ADN llevando a cabo una PCR multiplex en la que se utilizan seis pares de cebadores: SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 21, SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 23, SEC ID NO: 24, en las condiciones de 5 minutos a 95°C, 25 ciclos de 30 segundos cada uno a 95°C, 30 segundos a 58°C y 45 segundos a 72°C, seguido de 7 minutos a 72°C; y

c) detectar por medios adecuados los fragmentos amplificados en la etapa (b).

10. Procedimiento según la reivindicación 1 que comprende:

a) extraer una muestra de ADN de *Dicentrarchus labrax*;

b) amplificar dicha muestra de ADN llevando a cabo una primera PCR multiplex con seis pares de cebadores seleccionados del grupo que consiste en: SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 21, SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 23, SEC ID NO: 24 y una segunda PCR multiplex con los seis pares de cebadores restantes no utilizados en la primera PCR multiplex, llevándose a cabo las dos PCR multiplex en las condiciones de 5 minutos a 95°C, 25 ciclos de 30 segundos cada uno a 95°C, 30 segundos a 58°C y 45 segundos a 72°C, seguido de 7 minutos a 72°C; y

c) detectar por medios adecuados los fragmentos amplificados en la etapa (b).

11. Procedimiento según la reivindicación 10 en el que las dos PCR multiplex se llevan a cabo de manera secuencial.

12. Procedimiento según la reivindicación 10 en el que las dos PCR se llevan a cabo simultáneamente.

13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la etapa (c) comprende:

i) analizar la muestra resultante de la etapa (b) mediante electroforesis utilizando marcadores de peso molecular internos; y

ii) secuenciar los fragmentos identificados en la etapa (i).

14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que al menos uno de cada par de cebadores está marcado con una etiqueta de fluorescencia.

15. Kit para el genotipado de *Dicentrarchus labrax* mediante el procedimiento definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-14, que comprende al menos cinco pares de cebadores para llevar a cabo al menos una PCR multiplex, seleccionándose dichos pares de cebadores del grupo que consiste en: SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 21, SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 23, SEC ID NO: 24.

16. Kit según la reivindicación 15 que comprende los siguientes pares de cebadores para llevar a cabo una PCR multiplex: SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12.

17. Kit según la reivindicación 15 que comprende los siguientes pares de cebadores para llevar a cabo una PCR multiplex: SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 21, SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 23, SEC ID NO: 24.

18. Kit según la reivindicación 15, que comprende un primer grupo de pares de cebadores que consiste en: SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12, y un segundo grupo de pares de cebadores que consiste en: SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 21, SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 23, SEC ID NO: 24 para llevar a cabo dos PCR multiplex de manera secuencial o simultánea.

ES 2 330 177 B2

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Universidad de Málaga	
5	<120> Procedimiento y Kit para el genotipado de <i>Dicentrarchus labrax</i>	
	<130> P832ES00	
10	<160> 24	
	<170> PatentIn version 3.3	
15	<210> 1	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> cebador directo del locus Dla0007 de <i>Dicentrarchus labrax</i>	
25	<400> 1	
	agaaactgaa ctgactgctg c	21
30	<210> 2	
	<211> 21	
	<212> DNA	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso del locus Dla0007 de <i>Dicentrarchus labrax</i>	
40	<400> 2	
	cattgtgtgt ttagtgtaat c	21
45	<210> 3	
	<211> 20	
50	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> cebador directo del locus Dla0004 de <i>Dicentrarchus labrax</i>	
	<400> 3	
60	tccttccgtg aactgagagc	20
	<210> 4	
65	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	

ES 2 330 177 B2

	<220>		
	<223> cebador inverso del locus D1a0004 de <i>Dicentrarchus labrax</i>		
5	<400> 4		
	ctggcatcac aggacactgc		20
10	<210> 5		
	<211> 18		
	<212> DNA		
15	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador directo del locus DLY13158 de <i>Dicentrarchus labrax</i>		
20	<400> 5		
	aatacgggtgg tgaatcag		18
25	<210> 6		
	<211> 18		
	<212> DNA		
30	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> cebador inverso del locus DLY13158 de <i>Dicentrarchus labrax</i>		
	<400> 6		
40	gctgttgtct tgctgcat		18
	<210> 7		
	<211> 21		
45	<212> DNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
50	<223> cebador directo del locus D1a0009 de <i>Dicentrarchus labrax</i>		
	<400> 7		
55	caggaaagtc agtcaagcac a		21
	<210> 8		
60	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
65	<220>		
	<223> cebador inverso del locus D1a0009 de <i>Dicentrarchus labrax</i>		

ES 2 330 177 B2

	<400> 8	
5	tacacaacca tggatccatcc	20
	<210> 9	
	<211> 21	
10	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> cebador directo del locus Dla0020 de <i>Dicentrarchus labrax</i>	
	<400> 9	
20	gtctaattgag cagtggagca g	21
	<210> 10	
25	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> cebador inverso del locus Dla0020 de <i>Dicentrarchus labrax</i>	
	<400> 10	
35	gcatgttaga tccacatctt tc	22
40	<210> 11	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> cebador directo del locus Labrax9 de <i>Dicentrarchus labrax</i>	
50	<400> 11	
	tacagcacct cttgagaagg g	21
55	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> DNA	
60	<213> Artificial	
	<220>	
65	<223> cebador inverso del locus Labrax9 de <i>Dicentrarchus labrax</i>	

ES 2 330 177 B2

	<400> 12	
	ggcgtactgc aggaaaacag	20
5	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> DNA	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo del locus Dla12 de <i>Dicentrarchus labrax</i>	
15	<400> 13	
	gtatgttgcc agagccaagc	20
20	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> DNA	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso del locus Dla12 de <i>Dicentrarchus labrax</i>	
30	<400> 14	
	cagacaaact gtatgcctgc	20
35	<210> 15	
	<211> 20	
40	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223> cebador directo del locus Dla0008 de <i>Dicentrarchus labrax</i>	
	<400> 15	
50	aagctatctg atctcgcttg	20
	<210> 16	
55	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> cebador inverso del locus Dla0008 de <i>Dicentrarchus labrax</i>	
	<400> 16	
65	acgtgattaa gtgtttgtga g	21

ES 2 330 177 B2

	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> DNA	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo del locus Dla0011 de <i>Dicentrarchus labrax</i>	
10	<400> 17	
15	tcggagctga tattgtgcag	20
	<210> 18	
	<211> 21	
20	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> cebador inverso del locus Dla0011 de <i>Dicentrarchus labrax</i>	
	<400> 18	
30	ccccattgta acagcaagtt c	21
	<210> 19	
35	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> cebador directo del locus Dla0116 de <i>Dicentrarchus labrax</i>	
	<400> 19	
45	cacagccgaa aataatccag	20
50	<210> 20	
	<211> 20	
	<212> DNA	
55	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso del locus Dla0116 de <i>Dicentrarchus labrax</i>	
60	<400> 20	
	agaccgtaac acctgccaac	20
65	<210> 21	
	<211> 19	

ES 2 330 177 B2

<212> DNA

<213> Artificial

5 <220>

<223> cebador directo del locus Dla0016 de *Dicentrarchus labrax*

<400> 21

10

gtgaccgcag atgaagaac

19

15 <210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

20

<220>

<223> cebador inverso del locus Dla0016 de *Dicentrarchus labrax*

25 <400> 22

actgtgggct cataaacatc

20

30

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

35

<213> Artificial

<220>

<223> cebador directo del locus Dla0119 de *Dicentrarchus labrax*

40

<400> 23

gcagggttcaa attatTTTTg ctc

23

45

<210> 24

<211> 20

50

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

55

<223> cebador inverso del locus Dla0119 de *Dicentrarchus labrax*

<400> 24

60

tccttcctttt gcttgctagg

20

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 330 177

⑫ Nº de solicitud: 200701558

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 31.05.2007

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CHISTIAKOV, D. A., et al., "A microsatellite linkage map of the European sea bass <i>Dicentrarchus labrax</i> L.", GENETICS, 2005, Vol. 170, No. 4, páginas 1821-1826, todo el documento.	1-18
A	CHISTIAKOV, D. A., et al., "Development and linkage relationships for new microsatellite markers of the sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.)", ANIM. GENET., 2004. Vol. 35, No. 1, páginas 53-57, todo el documento.	1-18
A	TSIGENOPOULOS, C. S. et al., "Eleven new microsatellites of the sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.)", MOL. ECOL. NOTES, 2003, Vol. 3, páginas 352-354, todo el documento.	1-18
A	CASTILHO, R. et al., "Two polymorphic microsatellite markers in the European sea bass, <i>Dicentrarchus labrax</i> (L.)", ANIM. GENET., 1998, Vol. 29, No. 2, páginas 151-152, todo el documento.	1-18
A	GARCÍA DE LEÓN, F.J. et al., "Development and use of microsatellite markers in sea bass <i>Dicentrarchus labrax</i> (Linnaeus, 1758) (Perciformes: Serranidae)", MOL. MAR. BIOL. BIOTECHNOL, 1995, Vol. 4, páginas 62-68, todo el documento.	1-18
A	CIFTCI, Y. et al., "More polymorphic microsatellite markers in the European sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.)", MOL. ECOL. NOTES, 2002, Vol. 2, No. 4, páginas 575-576, todo el documento.	1-18
A	GARCÍA DE LEÓN, F. J. et al., "The application of microsatellite markers to breeding programmes in the sea bass, <i>Dicentrarchus labrax</i> ", AQUACULTURE, 1998, Vol. 159, No. 3-4, páginas 303-316, todo el documento.	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

20.11.2009

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 20.11.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-18	SÍ
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-18	SÍ
	Reivindicaciones		NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Chistiakov, D. A., et al., Genetics, (2005), 170(4): 1821-1826.	2005
D02	Chistiakov, D. A., et al., Anim. Genet., (2004), 35(1): 53-57.	2004
D03	Tsigenopoulos, C. S. et al., Mol. Ecol. Notes, (2003), 3: 352-354.	2003
D04	Castilho, R. et al., Anim. Genet., (1998), 29(2): 151-152.	1998
D05	García de León, F.J. et al., Mol. Mar. Biol. Biotechnol, (1995), 4: 62-68.	1995
D06	Ciftci, Y. et al., Mol. Ecol. Notes, (2002), 2(4): 575-576.	2002
D07	García de León, F. J. et al., Aquaculture, (1998), 159(3-4): 303-316.	1998

Observaciones sobre documentos:

D1-D7 describen la identificación de microsatélites polimórficos en *Dicentrarchus labrax* y su utilización como marcadores moleculares en análisis genéticos de poblaciones y en estudios de biodiversidad.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes).**

2.1. La presente invención satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-18, es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).**2.1. Reivindicación independiente 1.**

2.1.1. Se considera que cualquiera de los documentos D1-D6 constituyen el estado de la técnica más próximo. En D1 se describe la obtención de un mapa de ligamiento genético de *Dicentrarchus labrax* mediante la caracterización de 174 SSR de su genoma (c.f. D1: Figura 1; Materiales y Métodos; Resultados). En D2-D6 se describen varias secuencias microsatélite o SSR ('Short Sequence Repeat') de *Dicentrarchus labrax* útiles como marcadores genéticos para el genotipado de dicha especie. Además, se especifican los correspondientes pares de cebadores que permiten su amplificación mediante PCR (c.f. D2-D6: Tabla 1).

2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación independiente 1 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de un nuevo procedimiento para el genotipado de *Dicentrarchus labrax*.

2.1.3. La solución propuesta en la reivindicación independiente 1 es un procedimiento de genotipado de *Dicentrarchus labrax* que consiste básicamente en la detección de, al menos, 5 secuencias microsatélite elegidas de un conjunto de 12 secuencias de dicha especie que pueden ser amplificadas mediante una reacción PCR multiplex con los pares de cebadores SEC ID NOs: 1-2, SEC ID NOs: 3-4, SEC ID NOs: 5-6, SEC ID NOs: 7-8, SEC ID NOs: 9-10, SEC ID NOs: 11-12, SEC ID NOs: 13-14, SEC ID NOs: 15-16, SEC ID NOs: 17-18, SEC ID NOs: 19-20, SEC ID NOs: 21-22, SEC ID NOs: 23-24.

Según la descripción, los pares de cebadores mencionados permiten la amplificación específica de doce secuencias SSR de *Dicentrarchus labrax*, en particular, DLA0007 (AY221745), DLA0004 (AY221742), DLY13158 (Y13158), DLA0009 (AY221747), DLA0020 (AY26077), Labrax-9, DLA12 (AY125920), DLA0008 (AY221746), DLA0011 (AY221749), DLA0116 (AY302256), DLA0016 (AY26073) y DLA0119 (AY302259) (c.f.. Tabla 1).

Hoja adicional

En el estado de la técnica más próximo se han descrito varias secuencias microsatélite de *Dicentrarchus labrax* útiles como marcadores genéticos para su genotipado, así como los correspondientes pares de cebadores que permiten su amplificación específica mediante una reacción PCR simple (c.f. D1-D6). En concreto, en D1 se describe la construcción de un mapa de ligamiento genético de *Dicentrarchus labrax* mediante la caracterización de 174 SSR entre las que se incluyen las secuencias SSR analizadas en el procedimiento de la invención.

Por consiguiente, el alcance inventivo del procedimiento de genotipado de la reivindicación 1 radica tanto en la elección particular de doce secuencias SSR del conjunto de secuencias microsatélite de *Dicentrarchus labrax* conocidas en el estado de la técnica, como en la posibilidad de analizar simultáneamente, al menos, cinco de las doce secuencias SSR elegidas mediante el diseño de una reacción PCR multiplex apropiada.

Sobre la base del estado de la técnica más próximo, representado por D1-D6, junto con los conocimientos de uso y aplicación habitual en este campo de la técnica, se concluye que la solución propuesta por la solicitud internacional al problema técnico planteado no sería evidente para el experto en la materia. Por ello, el objeto de la reivindicación independiente 1 puede considerarse que es inventivo.

Según lo anteriormente expuesto, el objeto de las reivindicaciones 2 y 18 también se considera que es inventivo.

2.2. La presente invención satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-18, implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.